

Dubská L., Bačíková, L., Valík D.

Oddělení laboratorní medicíny, MOÚ Brno, dubska@mou.cz

Vyzrálé T-lymfocyty diferencují pod vlivem určitých faktorů veš funkčně odlišné subsety, které se liší produkcí rozdílných spekter cytokinů. Výchozí populace naivních T-lymfocytů se označuje Th0, které mohou diferencovat, zpravidla pod dlouhodobějším vlivem mikrobiálních antigenů, do Th1 subsetu; po stimulaci nebakteriálních a nevirových antigenů (často enviromentálního původu např. alergenů) do buněk Th2 subsetu a konečně mohou diferencovat do Th3 subsetu. Mimo specifickou antigenní stimulaci je pro vyzrání Th0 buněk určující cytokinové prostředí. Lymfocyty Th1 subsetu hrají úlohu především v buněčné cytotoxicitě, pro jejich vyzrání je nezbytná přítomnost IL-12, IL-18, IL-1, a IFN γ , a výsledkem je pak produkce cytotoxických mediátorů jako je IFN γ , IL-2 a TNF. Th2 lymfocyty hrají úlohu při regulaci tvorby protilátek, pro vyzrání do tohoto subsetu je nezbytná přítomnost IL-13 a IL-4. Th2 buňky pak produkují IL-4 (produkce protilátek), IL-5 (diferenciace eozinofilů), G-CSF (diferenciace granulocytů), IL-6 (hepatocytární produkce bílkovin akutní fáze) a také IL-2. Th3 buňky mají regulační úlohu protizánětlivého až imunosupresivního charakteru tlumící aktivitu Th1 buněk produkcí IL-10 a TGF β .

Práce týkající se Th1/Th2 imunitní odpovědi v onkologické problematice poskytují více otázek než odpovědí; Th1/Th2 poměr se často hodnotí jako poměr mezi CD4+ lymfocyty exprimujícími IFN γ a IL-4. Takto zjištěný zvýšený Th1/Th2 poměr byl demonstrován jako negativní prognostický faktor u pacientů s rakovinou plic. Naopak posun k proti-zánětlivé/imunosupresivní složce imunitní odpovědi podle jiné studie přispívá k progresi metastáz hepatocelulárního karcinomu a snížení počtu Th1 lymfocytů a Th1 cytokinů bylo také zachyceno u pacientů s kolorektálním karcinomem, přičemž s progresí nemoci se redukce Th1 složky imunitní reakce prohlubovala. Proti-zánětlivá až imunosupresivní složka v podobě zvýšené exprese IL-10 je spojována s různými maligními onemocněními jako je maligní melanom, karcinom ledvin a kolorektální karcinom, a je popisována jako negativní prognostický faktor odpovědi na léčbu, i když existují práce označující IL-10 za supresor nádorového růstu a metastáz.

Jeden z přístupů jak vyšetřovat rovnováhu mezi Th1 a Th2 složkami imunitní odpovědi je multiplexové stanovení cytokinů ve vzorcích tělních tekutin imunoanalýzou pomocí průtokové cytometrie. Pro naše účely jsme použili systém FlowCytomix Multiplex human Th1/Th2 Kit II (Bender MedSystems), který umožňuje souběžnou (v jedné zkumavce) detekci 10 cytokinů (IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , IL-12p70). Principem testu je interakce cytokinu s protilátkou navázanou na mikrosféru (kuličku) o určité fluorescenci. Hladina cytokinu je pak stanovena jeho interakcí s biotinylovanou protilátkou, která je dále značena streptavidinem-PE. V systému je tedy 10 různých typů kuliček tj. 2 velikostí 5 různých fluorescencí, které neinterferují s fluorescencí PE. Hladina jednotlivých cytokinů se odečítá z kalibrační křivky pro příslušný analyt.

Z technického hlediska jsme v první fázi zjišťovali vhodnost různých biologických materiálů pro stanovení, detekční rozmezí a variabilitu mezi jednotlivými měřeními. Porovnání periferní krve, séra a plazmy (Li-Heparin) ukázalo 1/ jednoznačně nejnížší výtěžek v případě séra, 2/ variabilní výtěžek pro jednotlivé analyty při srovnání plazma s periferní krev. Dále jsme se zaměřili na porovnání plazmy Li-Heparin a citrátové plazmy z hlediska reprodukovatelnosti signálu s mírně lepším výsledkem pro cit-

rátovou plazmu. Detekční rozmezí stanovené na souboru pacientek s karcinomem prsu v době před zahájením chemoterapie bylo napříč paletou cytokinů 0.0 pg/ml – 38.0 ng/ml, přičemž pouze IL-8 byl detekován u všech pacientů a ostatní analyty vykazovaly v tomto souboru pacientů značnou variabilitu od nulových hodnot po desítky ng/ml. Souběžná kvantifikace cytokinů pomocí průtokové cytometrie je možná v různých biologických materiálech, kdy je ovšem variabilní a patrně výrazně ovlivněná degra-dačními procesy. Reprodukovatelnost výsledků je poměrně dobrá na úrovni míry fluorescence, ale stanovení koncentrace některých cytokinů má horší reprodukovatelnost v závislosti na typu kalibrační křivky.

Z hlediska studia protinádorové imunity si od multiplexový způsobu detekce slibujeme vytipování a sledování určitých cytokinů v kontextu průběhu onemocnění (např. IL-10) a zhodnocení poměru mezi Th1 a Th2 imunitní odpovědi a zastoupením imunoregulačních buněčných subtypů hrajících patrně úlohu v průběhu onkologických onemocnění, např. NK-T buňky a regulační T-lymfocyty.

Tato práce byla podpořena Výzkumným záměrem grantem č. MZ000209805.

Literatura

1. Yamazaki, K., et al., Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Surgery*, 2002. 131(1 Suppl): p. S236-41.
2. Ito, N., et al., Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 2005. 25(3B): p. 2027-31.
3. Budhu, A., et al., Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*, 2006. 10(2): p. 99-111.
4. Nakayama, H., et al., Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 2000. 30(7): p. 301-5.
5. O'Hara, R.J., et al., Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(8): p. 1943-8.
6. Nemunaitis, J., et al., Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. *Cancer Invest*, 2001. 19(3): p. 239-47.
7. Wittke, F., et al., Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, 1999. 79(7-8): p. 1182-4.
8. Galizia, G., et al., Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. 22(4): p. 473-82.
9. Asadullah, K., W. Sterry, and H.D. Volk, Interleukin-10 therapy—review of a new approach. *Pharmacol Rev*, 2003. 55(2): p. 241-69.
10. De Vita, F., et al., Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer*, 1999. 86(10): p. 1936-43.
11. Erdman, S.E., et al., CD4(+)CD25(+) regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res*, 2003. 63(18): p. 6042-50.